

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300156

研究課題名(和文)長周期の毛周期時計を計測する新規皮膚時計機構の解明とヒト関連疾患の探索

研究課題名(英文)Characterization of a new mouse mutant strain with age- and hair cycle- dependent coat color change

研究代表者

山本 博章 (Yamamoto, Hiroaki)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：40174809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、長いスパンを持つ毛周期において未知の皮膚時計機構があることを予想させるC57BL/6J由来新規毛色変異体マウスの遺伝的基盤を明らかにし、多面発現の記載をも行うことを目的とした。

数系統との交配によるマイクロサテライトマーカーを用いた連鎖解析により、候補領域を約1.7 Mbまで絞ることができた。C57BL/6Nとの交配による、SNPサイトを利用したマッピングの試みは途中である。長い毛周期を研究対象とする困難さを痛感することとなった。一方、皮膚の肥厚や皮膚付属物における多面発現等、興味深い観察結果を蓄積することができた。ヒト疾患に同一とみなされる表現型の記載にはまだ気づいていない。

研究成果の概要(英文)：A novel coat color mutant mouse, named M2BBr, generated by saturation mutagenesis was analyzed. The mutant mouse changes its coat color from black to brown with aging (usually from the fourth or fifth postnatal hair cycle), associated with decreased expression of pigmentation genes necessary for synthesis of dark (black) melanin. In addition, in the brown coat color areas, each hair shows pigment type switching from black to brown and then to black from the tip to the base. This is a very peculiar phenomenon because the mutant mouse has homozygous nonagouti alleles (a/a) at the agouti locus and its coat color is expected to be fully black. This mutation also shows various pleiotropic effects causing unusual thickening of the skin and aberrant organization of various tissues. The candidate locus is within 1.7 Mb, in which about 60 loci are still included.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：毛周期 マウス 毛色変異体

## 1. 研究開始当初の背景

リズムを持った成体活動の維持機構は興味深い。研究が盛んな概日リズムの分子機構解明に比して、長い周期を持つ生物時計を安定的に繰り返させる機構は今日においてもまだ解明が進んでいない。本課題で対象とした毛周期は、性周期よりもはるかに長く、ヒトでは2~8年で、一生に8~10回以上生え替わる長い周期を持つ生物時計と言われてきた。マウスの毛周期は約30日である。この一周期は、休止期、成長期、退行期と3段階に大別されており、それぞれの段階での網羅的な遺伝子発現解析が進行しており、一周期内での概日リズムに関わる遺伝子発現のプロファイル等も明らかになりつつあった。しかし、その長い周期ゆえか、毛周期を繰り返し安定的に維持させる機構や、その周期と連動したヒト疾病は不明である。

本計画で解析対象としたマウス・M2BBra変異系統は、元々理化学研究所の大規模突然変異マウス作製計画から得られた。当初、加齢により白髪ではない毛色変化を示す優性突然変異体としてスクリーニングされた。それまでの我々の観察は、次の(1)~(4)で説明するように、皮膚に未知の時計機構があり、それに随伴した多臓器での構造、機能変動があることを強く示唆していた。

(1) 毛色変異について：このマウスの元々の遺伝的背景はC57BL/6Jであるので、終生黒い毛色(ノンアグチ、*a/a*)を示すはずであるが、茶毛色も発現させる。

(2) 毛色変化開始のタイミング：黒毛色は生後12週間(12W、以下同様)まで、即ち、新生児の毛を一回目として、毛周期3回分までであり、4回目の毛周期には「茶色」の毛色を肩部より後部の領域全身に発現する。対照のマウスは常に黒毛を作り続ける。

(3) 毛周期回数に依存した毛色の繰り返し：背側皮膚の胴体部の特定の場所に着目すると、4回目の毛周期以降、茶色と黒色を繰

り返す。つまり、1回目から3回目は全て黒、以後、4回目：茶、5回目：黒、6回目：茶、7回目：黒、と繰り返す。通常マウスでは頭部から尾部に向かって新しい毛周期が開始するため、この変異体マウスでは、背側を茶色と黒の帯が尾部に向かって移動する。加齢に伴ってこの毛色領域の境界に(野生マウス同様)乱れはできてくるが、毛周期の進行そのものはそのパターンと共に野生型と変わらない。一度変化した毛色が元に戻り繰り返すこと、それが毛周期2回に1回であることは大変興味深く既報の無い新しい現象であった。「毛周期時計」を更にカウントする未知の皮膚時計機構の存在を強く示唆するものと考えられた。

(4) 多面発現について：少数の試料による予備的な観察ではあったが、毛色だけでなく皮膚の肥厚等、組織構造にも多面発現が認められると予想できた。

このように興味深い変異体であるが、その原因遺伝子が未知であった。加齢とともに毛色変化を起こす、いわゆる白髪遺伝子がいくつか知られているが、本計画で用いる変異体はこれらとは全く表現型が異なる新しい変異体であり、他には同様の記載が見つけれなかった。原因遺伝子の同定と作用機序の解析から、皮膚の未知の時計機構だけでなく、他の組織臓器でも関連した長周期の生体現象が明らかになり、さらには同様のヒトの疾病の発見と、モデル動物の基盤も同時に整備できると考えた。なお、我々の予備的な解析から、目的の遺伝子座が染色体11番のテロメア側約4Mbの領域にあることが予想されていた。

## 2. 研究の目的

この興味深いマウス毛色変異体の原因遺伝子の同定と作用機序の解析から、皮膚の未知の時計機構だけでなく、他の組織臓器でも

関連した長周期の生体现象が明らかになり、さらには同様のヒトの疾病の発見と、モデル動物の基盤も同時に整備できると考えた。そこで、具体的にはこの変異体の原因遺伝子を突き止めることを喫緊の目標とし、同時に当該変異体が示す多面発現効果を組織化学的に詳細に解析し、原因遺伝子の機能予測を行い、さらにヒトオルソログを原因とする疾病を探索、その周期性の記載を確認することにした。

### 3. 研究の方法

当初、次のように計画した。

(1) 目的の遺伝子(座)が位置する染色体 11 番のテロメア側約 4 Mb の領域を連鎖解析で絞りこむ。場合によっては、黒毛色、茶毛色の皮膚領域について、当該領域に連動して発現が変動する遺伝子を絞り込む。

#### NZB 系統を用いたマッピング

それまで我々が行った予備的な交配解析は、M2BBrA 変異体原因遺伝子(座)はマウス第 11 番染色体テロメア側、4 Mb 以内の約 150 遺伝子座からなる領域に位置することを強く示唆していた。そこで、この領域を狭めるために、遺伝的背景を C57BL/6J に持つオリジナルの変異体系統と、それを異にする NZB 系統(黒毛色である。茶毛色に変化した際にその色調の変化の検出が容易)を交配し、その子孫マウスについて、当該領域のマイクロサテライトマーカを用いて連鎖解析を行おうとした。

さらに、日本産野生マウス由来 MSM 系統第 11 番染色体を持つコンソミックマウス系統(B6-Chr11MSM)との交配も行う。

2 Mb 位に候補領域が狭められれば、その領域にマップされている遺伝子について皮膚での発現を検出する。

(2) 次に候補遺伝子について塩基配列解析を行う。得られた原因候補遺伝子について、その多面発現効果を加味してデータベースを検索し、その可能性を高める。

(3) その後、当該遺伝子(単一もしくはごく少数の候補遺伝子)の *in vivo* での検証を、遺伝子改変マウスを作製して確認する。一方で、

(4) 当該遺伝子の発現解析を全身に渡って組織化学的、また分子生物学的に行い、当該遺伝子の作用機序を推察する。これらと同時に、

(5) ヒトオルソログを原因とする疾病の記載を OMIM 等で検索する。もし記載がない場合は、予想される臨床領域との連携を計画する。これらの過程で利用するマウス変異体を潜在的な疾患モデルとして公開する。

### 4. 研究成果

#### (1) 責任遺伝子のマッピングについて

NZB 系統マウスとの交配自体は順調に進んだが、表現型の浸透度が低く、変異の表現型をはっきり示し、積極的にマッピングに利用できる個体数が十分ではなかった。つまり明らかに野生型と判別できる個体を選別することが大変困難であったわけである。従って、明確に変異表現型を示す個体のみを解析を行わざるを得なかった。本計画開始時までの当該系統の維持において、この傾向は当初より予想はし、また覚悟はしていたが、結果的にそれ以上に重要な問題となった。しかしながら、11 番染色体のテロメア側の 1.7Mbp の領域まで狭めることができた。

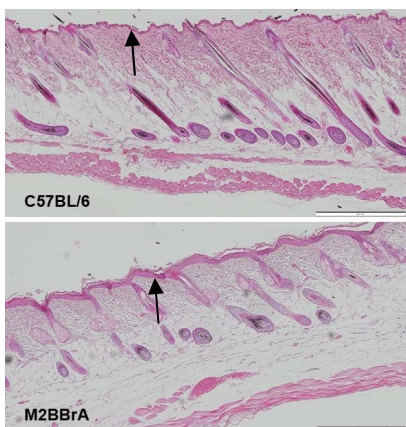
途中で導入したコンソミックマウス系統(B6-Chr11MSM)との交配においては、産仔数が非常に少なく、維持はしてきたが、終了時までには解析に用いることができる変異表現型を明確に示す個体が数個体も得られなかった。

NZB 系統のマーカーも探索しながらの解析には、多大な時間を要するので、途中から、C57BL/6N の全塩基配列情報が利用できることを利用して、当該変異系統との交配を開始し、得られた子孫マウスについて SNP サイトを利用したマッピングを行うことを

計画し、実行に移した。幸いにも、数ラインで表現型をはっきりと弁別できる集団が得られ始めたので、解析を急いだが、最終年度においても最初のデータが得られる直前までしか進めることができなかった。結果的に、本研究の特徴である長い毛周期を研究対象とする困難さを痛感することとなった。

着目領域に含まれ、データベースの検索からその機序について原因遺伝子として可能性があるとされる遺伝子群については、その発現の変動をまずは半定量的に(マウス背側皮膚の前後軸に沿って)解析した。しかし、毛周期に従って多くの遺伝子はその発現を変動させており、野生型と比べて顕著な発現変動を示す遺伝子の検出には至っていない。

(2) 一方、独立して同時に継続していた組織化学的解析は、手法の改良も進み、皮膚の肥厚や皮膚付属物と毛周期ウェイブとの関係を始め、興味深い観察結果を蓄積することができ、我々の知る限りにおいて、これまでに報告のない表現型であることに確信を持つことができるようになった。一例を次に示す。コントロールのC57BL/6に比してM2BBraAの表皮(矢印)の肥厚が著しい。



またヒト疾患の報告についても、同一とみなされる表現型の記載にはまだ気づいていない。

以上、マッピングについては領域をわずかに狭めるところまでとなってしまったが、表

皮や皮脂腺の肥厚など、興味深い多面発現効果を確認できた。いずれにしても、同様の表現型が記載されたマウス変異体の報告は、少なくとも我々は知らず、長い周期を持つ生物時計の解明に、今後も機会があればチャレンジしたい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

山本博章、色素細胞の多様な機能発現について、Fragrance Journal、査読無、40巻、2012、37-40.

[学会発表](計 3 件)

山本博章、色素細胞の発生と機能発現機構環境ストレス緩和、日本化粧品学会、2012年6月7日、有楽町朝日ホール(東京)

山本博章、マウスを用いた色素細胞新機能の探索、日本実験動物科学技術さっぽろ2014(招待講演)、2014年05月15日~2014年05月17日、札幌コンベンションセンター(札幌)

Yamamoto, Hiroaki, Functional divergence of mammalian melanocytes, XXII International Pigment Cell Conference (IPCC2014) (invited), Sept. 04, 2014 – Sept. 07, 2014, Shangri-La Hotel (Singapore)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山本 博章 (YAMAMOTO, Hiroaki)  
長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・  
教授

研究者番号：40174809

##### (2) 研究分担者

田村 勝 (TAMURA, Masaru)  
独立行政法人理化学研究所・バイオリソ  
スセンター・開発研究員

研究者番号：50370119

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：